

氏名 苔 口 進

学位(専攻分野) 博 士(歯 学)

学位授与番号 博 乙 第 2416 号

学位授与の日付 平成 4 年 3 月 28 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第4条第2項該当)

学位論文題目 *Wolinella recta* ATCC 33238の表層蛋白抗原に関する研究

論文審査委員 教授 加藤慶二郎 教授 村山 洋二 教授 谷口 茂彦

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

口腔内グラム陰性嫌気性菌が歯周病の発症と進行とに深く関係することが明らかとなってきた。その中で若年性あるいは成人性歯周病巣から高頻度に分離される*Wolinella recta*の外膜表層にはhexagonalな表層蛋白構造物が存在し、この構造物は他のグラム陰性嫌気性歯周病細菌には見られず*W. recta*に特徴的であることが電顕学的研究により明らかにされている。歯周病の病因と細菌との相互関係を明らかにする研究の流れとして、口腔内グラム陰性嫌気性菌の検出あるいは宿主との免疫応答を検索する上で有用な口腔細菌の特異抗原の検索が現在進められている。そこで本研究では*W. recta*のこの特徴的な外膜表層蛋白を分離精製し、その化学的性状ならびに細胞表層における局在を明らかにするとともに歯周病患者血清との反応を検討した。

【材料および方法】

①菌の培養と表層蛋白の抽出および精製：*W. recta* ATCC 33238をギ酸、フマル酸を添加したTodd-Hewitt brothにて嫌気条件下、37℃、48時間培養した。遠心集菌した菌体をPBSに懸濁し、菌懸濁液のpHをHClでpH2.0に調整し、30分間室温で攪はん抽出した。遠心上清を濾過して菌体を除去し、中和後硫酸分画(65%飽和)した。10mM磷酸緩衝液(pH7.4)に透析後、DE-52カラムにかけ、非吸着画分を濃縮後さらにToyopearl HW-65カラムのゲル濾過により精製を行った。

②化学分析等：アミノ酸、アミノ糖分析は試料を6NHCl中110℃14時間加水分解後、高速液体クロマトグラフ装置(東洋ソーダ CCP&8000)により分析した。N末端アミノ酸分析は改良自動エドマン法を用いた自動アミノ酸配列分析装置(アプライドバイオシステムズ社Model 477 A Sequenser)により行った。等電点はアンホラインを担体としたポ

リアクリルアミドゲルで電気泳動し、pIマーカーの泳動距離より求めた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）はLaemmliの方法で行い、精製蛋白と歯周病患者血清との反応をTowbinらおよび村山らの方法に従って、イムノブロット法およびELISA法によって調べた。

③家兎抗血清の作成および金コロイド標識抗体電顕法：精製酸抽出抗原を常法に従い、Compleate Freund's adjuvantとともに家兎に免疫して得た。免疫家兎血清で処理した *W. recta* 菌体を洗浄後、ヤギ抗家兎IgG抗体-金コロイド複合体（Auroprobe; 10nm）で標識した。次いで、1%リンタングステン酸でネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡（日立H-800）で観察した。

【結果ならびに考察】

酸性条件下で菌体を処理して得た抽出物をSDS-PAGEによって分析した結果、*W. recta* の標準菌株および臨床分離株からは高分子量の蛋白が多量にまた特異的に抽出されることが判り、*W. recta* ATCC 33238の酸抽出物から分子量約15万の蛋白を精製した。しかしこの蛋白は*W. recta*, *W. succinogenes* さらに *Bacteroides* 属をはじめとする他の口腔細菌には検出されなかった。酸抽出によって *W. recta* から得られる蛋白は菌体から機械的破碎によって遊離すること、膜画分として得られるもののN-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムによって可溶化されること等から菌体表層蛋白であることが判った。精製酸抽出抗原のpIは7.0~7.3で、システインは含まれず、疎水性、酸性アミノ酸の割合はそれぞれ32%, 27%であった。グルコサミン、ガラクトサミン等のアミノ糖は検出されなかったが、ラムノースを主構成成分とした糖が約0.5%および脂肪酸が約0.5%含まれていた。N末端アミノ酸配列はAla-Leu-Thr-Gln-X-Pro-Pro-Gln (Lys).....であり、表層蛋白が報告されている *Campylobacter*, *Aeromonas* 属等のそれとは異なっていた。免疫電顕による観察で、金コロイド標識は格子状構造物がみられる *W. recta* の細胞表層にのみ標識されており、鞭毛部分には認められなかった。また正常家兎血清処理では全く菌体表層に金コロイド標識はされなかった。イムノブロット法によって *W. recta* の精製酸抽出抗原は健常人血清とは全く反応しなかった。が、歯周病患者血清のなかには強く反応するものがあった。またこの抗原に対して歯周病患者血清抗体価の有意な上昇がELISA法により観察された。なかでも健常人にくらべ、患者群のなかに特に著しく血清抗体価の高い患者がみられた。これは *W. recta* の特異な感染によるものかまた宿主の特異な免疫応答の結果であろう。

以上の結果は、*W. recta* の細胞表層に局在する特異な蛋白は本菌を酸処理することによって抽出されることを示し、この蛋白の化学性状と抗原としての反応原性について明らかにし、本蛋白が *W. recta* の同定の指標となることならびに歯周病患者の血清学的診断の反応原として有用であることを示している。

論文審査の結果の要旨

本論文は若年性あるいは成人性歯周病巣から高頻度に分離される *Wolinella recta* の細胞表層に存在し、六角形状に配列する蛋白質を抽出・精製し、その化学的性状と抗原的性状について記述したものである。

W. recta の菌体を希塩酸 (pH2.0) 処理してえた抽出液から硫酸塩析、ゲルろ過によってSDS-PAGEで分子量約15万の単一バンドを示し、pIは7.0~7.3の蛋白質を精製した。精製標品の構成アミノ酸にシステインは含まれず、疎水性および酸性アミノ酸の割合は32%および27%であり、N末端アミノ酸配列 (9 アミノ酸) は従来報告されていない独自のものであった。他の *Wolinella* 属および *Bacteroides* 属などの細菌菌体からは同様の蛋白質は酸によって抽出されなかった。

本蛋白質を抗原としてえた家兎抗血清を用いた免疫電顕法によって、本蛋白質が細胞表層に存在することおよび酸処理によって菌体表層から消失することを示した。

イムノブロット法によって本蛋白質と歯周病患者血清との反応が見られたが、正常人血清とは反応しなかった。またELISA法によって歯周病患者血清中に本蛋白質に対する抗体価の有意な上昇が認められた。

以上のように *W. recta* の細胞表層に局在する特異な蛋白質の化学性状と抗原性状について明らかにし、本蛋白質が *W. recta* の同定ならびに歯周病患者の血清学的診断において有用であることを示したものであり、本論文を博士 (歯学) 学位論文として価値あるものと認めた。